

Trabalho de Conclusão de Curso

Engenharia de Tecido Pulpar: Revisão de Literatura e Perspectivas Futuras

Roberto Selonk Buechele



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

Roberto Selonk Buechele

**ENGENHARIA DE TECIDO PULPAR: REVISÃO DE LITERATURA E
PERSPECTIVAS FUTURAS**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Odontologia.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mabel Mariela R Cordeiro

Florianópolis

2016

Roberto Selonk Buechele

**ENGENHARIA DE TECIDO PULPAR: REVISÃO DE LITERATURA E
PERSPECTIVAS FUTURAS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 20 de Outubro de 2016.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a . Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro,
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Michelle Tillmann Biz
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Ariadne Cristiane Cabral da Cruz
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

**Dedico este trabalho aos meus pais, à
minha irmã, aos meus avós e à minha
namorada por me fazerem acreditar
que através de muito esforço e
dedicação nenhum sonho é impossível.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo Armínio e Beatriz, pelo amor incondicional. Obrigado por me ensinarem o valor da persistência e da dedicação, pelo apoio e conforto nos momentos mais difíceis, por terem me permitido sonhar e correr atrás dos meus sonhos. Vocês possuem todo o meu carinho, amor e respeito.

Aos meus avós, por desempenharem esse papel tão bem. Obrigado por serem tão presentes em minha vida, por terem participado do meu crescimento profissional e pessoal e por serem uma parte do que sou hoje. Vocês possuem um espaço especial em meu coração

À minha irmã, Isadora, que me acompanhou desde o começo e me deu o apoio necessário para continuar, que mesmo estando longe esteve perto e que sempre esteve pronta para me ajudar. Obrigado por ser minha irmã.

À minha namorada, Bárbara, pelo companheirismo e pelos incentivos dados nas horas certas. Obrigado pelo apoio, por acreditar em mim, por me aturar todos esses anos, por ser essa companheira fantástica, por cuidar tão bem de mim e me fazer tão feliz. Te amo muito!

À minha tia, Adriana, por ter despertado em mim a paixão pela Odontologia. Obrigado pelo exemplo de pessoa que és, pelo carinho, pelo apoio e pelas inúmeras oportunidades que me ofereceste. Obrigado por ser uma tia tão presente mesmo estando longe.

Aos meus sogros, Cláudia e Eduardo, por todo o carinho, apoio e incentivo. Obrigado por terem me acolhido tão bem e por sempre torcerem por mim.

À minha orientadora, professora Mabel, pelos ensinamentos, pela paciência e pela dedicação comigo. Obrigado por ser um exemplo de profissional e por ter me aberto tantas portas para o futuro.

Aos meus amigos, em especial ao Faria e ao Shenon, por terem me acompanhado nessa jornada. Obrigado pelas risadas e pelo apoio durante todos esses anos. Vocês com certeza fazem a minha vida mais divertida.

A todos os mestres com quem tive o prazer de aprender, em especial a professora Analucia Philippi, pela paciência e dedicação na transmissão do conhecimento, pelas

oportunidades e por me fazer enxergar uma Odontologia que nem todos enxergam. Muito obrigado!

A todas as pessoas que sempre acreditaram e torceram por mim. Vocês estão guardados em meu coração.

**“A verdadeira coragem é ir atrás
de seus sonhos mesmo quando
todos dizem que eles são
impossíveis.”**

(Cora Carolina)

RESUMO

A engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar que abrange conhecimentos biológicos, de engenharia e de ciências clínicas. Seu objetivo principal visa à substituição de tecidos ou órgãos do corpo humano lesados ou perdidos e que atualmente não podem ser repostos. Dentro desse contexto, a engenharia de tecido pulpar humano tem como objetivo a reposição da polpa dentária inflamada ou necrótica por um novo tecido com funções semelhantes ao original, permitindo, por exemplo, o completo desenvolvimento vertical e lateral das raízes de dentes permanentes jovens que necessitam de terapia endodôntica. Para que isso se torne realidade é necessário a identificação de células-tronco apropriadas, o desenvolvimento de arcabouços e o uso de inúmeros fatores de crescimento. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi apresentar o estado atual da engenharia de tecido pulpar humano, através da leitura de artigos recentes (do ano 2000 a 2016) encontrados nas bases de dados LILACS, Scielo e PubMed, identificando a participação das células-tronco, dos arcabouços e dos fatores de crescimento relacionados ao tema proposto. Na revisão da literatura, constatou-se que as células-tronco possuem a capacidade de auto renovação, a habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular e a vocação de gerar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem. Elas podem ser classificadas de acordo com seu potencial em totipotentes, pluripotentes e multipotentes ou então, de acordo com a sua fonte em embrionárias, pós-natais e adultas. Assim, as células-tronco de origem dental, principalmente as da polpa de dentes decíduos, se tornaram altamente atrativas para a engenharia de tecidos devido a sua fácil acessibilidade e sua capacidade de se diferenciar em inúmeros tipos celulares, tais como odontoblastos-like, adipócitos-like, células neurônio-like, osteoblasto-like, condrócito-like, melanócito-like e células endoteliais-like. O segundo fator envolvido na engenharia tecidual de polpa dental, os arcabouços, são um dos grandes objetos de estudos dessa área, pois proveem o ambiente necessário para o crescimento e diferenciação celular. Foi encontrado que há diversos tipos de materiais que podem ser empregados para a construção dos arcabouços, incluindo materiais biológicos, como o colágeno, e sintéticos, como os polímeros de ácido poli-L-lático. Enquanto os primeiros parecem facilitar a adesão e manutenção da diferenciação celular, os arcabouços de materiais sintéticos permitem um controle mais preciso do peso molecular, do tempo de degradação e de outros atributos, porém podem não interagir com as células da maneira desejada. Finalmente, para que as células-tronco proliferem e se diferenciem é necessária a presença de uma gama de moléculas, com expressão temporal e espacial determinantes, que serão responsáveis pelo aporte de

nutrientes e pela criação de um meio propício a sua diferenciação. Especificamente na engenharia de tecido pulpar, os estudos apontam claramente a necessidade de fatores de crescimento provenientes da dentina e da pré-dentina para que aconteça o adequado estímulo das células-tronco no que se refere à sua diferenciação e quimiotaxia para organização do tecido neoformado. Ainda, foi possível constatar que, embora empolgante, a implementação da engenharia de tecido pulpar na prática clínica do cirurgião-dentista não deve ocorrer tão cedo, visto que diversas barreiras éticas, religiosas e principalmente biológicas ainda persistem. Sendo assim, o estudo constante e o avanço das pesquisas sobre esse tema são justificados pelo amplo espaço que a engenharia tecidual vem ganhando na Medicina e, mais recentemente, na Odontologia onde vem sendo estudada com a finalidade de constituir-se como uma nova modalidade de tratamento.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos. Polpa dental. Células-tronco.

ABSTRACT

Tissue engineering is a multidisciplinary field that involves knowledge from biology, engineering and clinical science. Its main objective involves the replacement of human injured tissue or organs that cannot be replaced nowadays. The dental pulp engineering aims the creation of a new tissue similar to a dental pulp allowing, for example, the complete root formation in cases of endodontic treatment in immature permanent teeth. However, its use in medicine still involves the recognition of the right kind of stem cells; the development of different scaffolds and the use of many grow factors. The objective of this study is to present the state of art of dental pulp tissue engineering, through the reading of recent studies (from the year 2000 to 2016) found it in databases such as LILACS, Scielo and PubMed and identify the role of stem cells, scaffolds and grow factors. It was observed that stem cells are known for their capacity of self-renew and for their ability to differentiate in more than one cell lineage. They can be classified accordantly to their potential in totipotent, pluripotent or multipotent stem cells or accordantly to their source in embryonic, fetal or adult stem cells. Furthermore, stem cells from dental origin, especially those from the dental pulp of deciduous teeth, have become more attractable to tissue engineering due its easy access and capacity to differentiate in many cell types, such as osteoblast, chondrocytes, melanocytes and endothelial cells. The scaffolds are also important when studying dental pulp tissue engineering. They are responsible for the creation of the microenvironment that allows stem cells to grow and differentiate. This review describes a variety of materials used to build different scaffolds such as collagen, a natural material that seems to facilitate the bond and the differentiation of the stem cells or Poli-L-lactic acid, a synthetic material that enables a rigorous control of the molecular weight and the time of degradation of the scaffolds. On the other hand, synthetic materials do not interact with the stem cells the way we want it. This study also describes the role of a variety of the grow factors that are responsible for the provision of nutrients and most important, for the creation of the ideal environment for the stem cell differentiation. Finally, this literature review demonstrate that the studies that have been published about dental pulp engineering has showed the necessity of grow factors from dentin, since they induce the differentiation of stem cells and also are responsible for the organization of the newly formed tissue. Although extremely important for the future of dentistry, it was concluded that more time is needed for the implementation of dental pulp tissue engineering in dental offices due to ethical, religious and biological barriers. Therefore,

this literature review is justified due to the enormous growth of tissue engineering in Medicine, and more recently in Dentistry.

Keywords: Tissue Engineering. Dental Pulp. Stem Cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE	-Associação Americana de Endodontistas (do inglês, American Association of Endodontics)
ALP	-Enzima Fosfatase Alcalina (do inglês, alkaline phosphatase)
BMP	-Proteína da Matriz Óssea (do inglês, bone morphogenetic protein)
BSP	-Sialoproteína do Osso (do inglês, bone sialoprotein)
CEM	-Cimento Rico em Cálcio (do inglês, calcium enriched mixture)
CTA	-Células-Tronco Adultas
CTE	-Células-Tronco Embrionárias
DGP	-Glicoproteína Dentinária (do inglês, dentin glycoprotein)
DMP	-Proteína da Matriz Dentinária (do inglês, dentin matrix acidic phosphoprotein)
DPP	-Fosfoproteína Dentinária (do inglês, dentin phosphoprotein)
DSP	-Sialoproteína Dentinária (do inglês, dentin sialoprotein)
DPSC	-Células-Tronco da Polpa de Dentes Permanentes (do inglês, dental pulp stem cells)
DSPP	-Sialofosfoproteína Dentinária (do inglês, dentin sialophosphoprotein)
ECM	-Matriz Extracelular (do inglês, dentin extracellular matrix)
HA/TCP	-Discos de cerâmica contendo hidroxiapatita e Fosfato tricálcio (do inglês, tricalcium phosphate/hydroxyapatite)
HDMEC	-Células Endoteliais da Microvasculatura da Derme Humana (do inglês, human dermal microvascular endothelial cells)
HDPC	-Células da Polpa Dental (do inglês, human dental pulp cells)

HMSC	-Células-Tronco da Medúla Óssea (do inglês, human bone marrow stromal cells)
hTGSC	-Células-Tronco de Germes Dentais Humanos (do inglês, human tooth germ stem cells)
MIB	-Massa Interna do Blastocisto
NaOCl	-Hipoclorito de Sódio
NC	-Grupo Controle Negativo (do inglês, negative control)
NCP	-Proteínas Não Colágenas (do inglês, non-collagenous proteins)
PC	-Grupo Controle Positivo (do inglês, positive control)
PDLSC	-Células-Tronco do Ligamento Periodontal (do inglês, periodontal ligament stem cells)
PGA/PLLA	-Arcabouço de Poliglicolato e Ácido Poli-L-Láctico (do inglês, polyglycolic acid/ poly-L-lactic acid)
PLLA	-Ácido Poli-L-Láctico (do inglês, poly-L-lactic acid)
SCAP	-Células-Tronco da Papila Apical (do inglês, stem cell from apical papilla)
SHED	-Células-Tronco da Polpa de Dentes Decíduos (do inglês, stem cells from human exfoliated teeth)
TAP	-Pasta Tripla de Antibiótico (do inglês, triple antibiotic paste)
VEGF	-Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês, vascular endothelial growth factor)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	211
2 JUSTIFICATIVA.....	233
3. OBJETIVOS	244
3.1 Objetivo Geral	244
3.2 Objetivos Específicos.....	244
4. MATERIAL E MÉTODOS	255
5. REVISÃO DE LITERATURA	266
5.1 Células-tronco	277
5.2 Arcabouços.....	30
5.3 Moléculas indutoras	355
5.4 Estudos com modelos de engenharia de tecido pulpar.....	388
6. DISCUSSÃO.....	455
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	511

1. INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa vem se desenvolvendo nos últimos anos com o contínuo descobrimento do potencial das células-tronco. Espera-se que, num futuro próximo, seja possível substituir ou restaurar tecidos perdidos por trauma ou doenças através da semeadura de células-tronco em arcabouços e do transplante desses para o paciente (CORDEIRO et al., 2008). Dentre as inúmeras possibilidades advindas desse campo, a oportunidade de se originar um tecido pulpar humano semelhante ao original, em dentes imaturos, é altamente empolgante, pois a terapia endodôntica atual ainda resulta em dentes com paredes radiculares finas e frágeis. Nesses casos, a deposição lateral de dentina que ocorre paralelamente ao desenvolvimento da raiz é interrompida devido ao processo necrótico advindo da polpa, fato que contribui para a falha desse tipo de tratamento em longo prazo (ROSA et al., 2013; SAKAI et al., 2011).

A engenharia de tecidos constitui-se num campo multidisciplinar, visto que envolve conhecimentos biológicos, de engenharia e de ciências clínicas. Seus princípios básicos envolvem a identificação de células apropriadas, o desenvolvimento de arcabouços e o entendimento dos sinais morfogênicos requeridos para induzir a regeneração tecidual ou do organismo por parte dessas células (CASAGRANDE et al., 2011). Sendo assim, para que seja possível o estudo dessa área do conhecimento, é necessário compreender melhor esses três fatores.

A auto-renovação, a habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular e a vocação para gerar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem são propriedades comuns às células-tronco. Essas células podem ser classificadas de acordo com a seu potencial de diferenciação em totipotentes, pluripotentes e multipotentes, ou de acordo com a sua fonte, sendo então classificadas como embrionárias, fetais ou adultas. O uso de células-tronco embrionárias em estudos laboratoriais e clínicos é controverso devido a questões éticas e legais; assim, a descoberta de células-tronco no tecido pulpar de dentes decíduos se tornou altamente atrativa para a engenharia de tecidos. Essas células apresentam menor potencial de diferenciação, porém, através da correta indução, possuem a capacidade de originar células odontoblastos-like, adipócitos-like, neurônio-like, osteoblasto-like, condrócito-like, melanócito-like e células endoteliais-like. Ainda, cabe ressaltar que, por ser uma área de estudo relativamente nova, é comum a confusão de termos. Nesse sentido, é importante diferenciar as células-tronco das células progenitoras, como as oligopotentes e as

unipotentes, as quais possuem um potencial de auto-renovação mais limitado (PONNAIYAN, 2014; SCHWINDT et al., 2005).

O uso isolado das células-tronco não é suficiente para possibilitar a engenharia tecidual. É necessária a associação das células com estruturas que deem suporte a elas; essas estruturas são chamadas de arcabouços. Através deles, as células obtêm o ambiente necessário para adesão, proliferação, migração e diferenciação, até possuírem a capacidade de secretar seu próprio microambiente (CASAGRANDE et al., 2011). Cordeiro et al., em 2008, estudaram um modelo de arcabouço a partir de fatias de dentes que foram introduzidos no dorso de camundongos imunodeficientes. Originou-se um tecido pulpar semelhante ao tecido original. Já Demarco e colaboradores, em 2010, demonstraram a importância das propriedades físicas e da superfície dos arcabouços através do estudo com polímeros naturais e sintéticos. Rosa et al., em 2013, apresentaram um modelo onde células-tronco da polpa de dentes decíduos (SHED) foram semeadas em toda a extensão do canal radicular. Também em 2013, Cavalcanti e colaboradores confirmaram a importância de hidrogéis (Puramatrix®) como arcabouço, os quais, além de fácil adaptação ao canal radicular, permitiram a viabilidade, proliferação e diferenciação de células-tronco, evidenciadas pela expressão de marcadores típicos de células odontoblasticas. O conhecimento das moléculas capazes de induzir a diferenciação das células-tronco e seus mecanismos de ação também se faz necessário no âmbito da engenharia de tecidos. Essas moléculas podem servir de guia e coordenar processos celulares. A matriz dentinária apresenta diversas moléculas indutoras de geração de dentina terciária e reparos da polpa dental. A seleção desses fatores de crescimento pode induzir uma reparação dentinária, fato extremamente interessante para o campo da engenharia tecidual (CORDEIRO et al., 2008; CASAGRANDE et al., 2011).

O descobrimento do potencial das células-tronco de origem dental aliado ao estudo de moléculas indutoras e às pesquisas e avanços no desenvolvimento de arcabouços que preencham as necessidades das células, torna essa área de estudo extremamente interessante no campo odontológico. O objetivo desta revisão de literatura foi apresentar conceitos e conhecimentos existentes sobre o tema, bem como o estágio atual da engenharia de tecido pulpar.

2 JUSTIFICATIVA

Os recentes avanços da engenharia de tecidos podem mudar as práticas diárias do cirurgião-dentista. Através do uso de células-tronco, procura-se criar novas técnicas clínicas que permitam a substituição de um tecido dental danificado por outro totalmente novo e que apresente a mesma função do antigo, fato que não é possível com os procedimentos restauradores realizados atualmente nos consultórios. Assim, por exemplo, o propósito da engenharia de tecidos periodontais é estabelecer novas técnicas no manejo do paciente com doença periodontal através da regeneração e criação de novos tecidos periodontais (ROSA et al., 2012).

Embora altamente promissora, a decisão de incorporar terapias usando células-tronco na clínica odontológica requer uma análise cuidadosa dos riscos e benefícios associados. É inquestionável que o processo de se armazenar e manipular essas células em laboratórios e depois transplantá-las novamente para o paciente apresenta certos riscos que, embora pequenos, não podem ser ignorados. O futuro da engenharia de tecidos depende do entendimento da biologia das células que serão empregadas e as suas fronteiras serão demarcadas com o conhecimento profundo dos procedimentos realizados (CASAGRANDE et al., 2011).

É somente através das pesquisas e de um sólido conhecimento teórico e laboratorial que os potenciais riscos inerentes ao uso dessas células serão compreendidos e, conseqüentemente, prevenidos e, então, será possível sua implementação na prática clínica (CASAGRANDE et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Realizar uma revisão da literatura sobre a engenharia de tecido pulpar humano.

3.2 Objetivos Específicos

- Apresentar o estado da arte sobre as pesquisas relacionadas à engenharia de tecido pulpar humano;
- Descrever a participação das células-tronco na engenharia de tecido pulpar humano;
- Descrever os principais tipos de arcabouços empregados na engenharia de tecido pulpar humano;
- Apresentar os principais fatores de crescimento envolvidos na engenharia de tecido pulpar humano.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado por meio de um levantamento bibliográfico de artigos e livros atuais e clássicos relacionados ao tema de engenharia de tecido pulpar humano.

Os artigos lidos para esta revisão foram pesquisados nas bases de dados PubMed, LILACS, Scopus, Web of Science e SciELO, e também em ferramentas de busca como o Google Acadêmico.

Os termos em português pesquisados foram: células-tronco, engenharia de tecidos, odontoblastos, fatores de crescimento diferenciação celular, arcabouços, endodontia, dentina, regeneração pulpar e células endoteliais. Os termos em inglês incluíram: *stem cells*, *tissue engineering*, *dental pulp*, *odontoblasts*, *growth factors*, *differentiation*, *scaffolds*, *endodontics*, *dentin*, *pulp regeneration*, e *endothelial cells*. Os artigos analisados foram os que abordavam o uso de células-tronco da polpa dental de dentes permanentes e/ou decíduos na engenharia de tecido pulpar, a utilização de diferentes tipos de arcabouços que permitiram manipular essas células, os fatores de crescimento necessários para que a engenharia de tecido pulpar se tornasse aplicável à clínica odontológica, bem como estudos que avaliaram o potencial de diferenciação das células-tronco de origem dentária em odontoblastos e células endoteliais. Estudos que abordassem o estado atual da engenharia de tecido pulpar também foram utilizados.

Foram selecionados artigos publicados no período compreendido entre o ano de 2000 e 2016, incluindo pesquisas laboratoriais e clínicas, revisão de literatura e revisão sistemática nas línguas portuguesa e inglesa.

Os dados apresentados nessa revisão da literatura foram obtidos através da leitura dos trabalhos na íntegra e os dados levantados foram agrupados em subitens com o objetivo de sistematizar os achados.

5. REVISÃO DE LITERATURA

A engenharia tecidual é um campo multidisciplinar que reúne conhecimentos de biologia, de engenharia e de ciências clínicas com o objetivo de restaurar, manter ou melhorar a função de um tecido (LANGER & VACANTI, 1993). Através da identificação de células-tronco apropriadas, do desenvolvimento de arcabouços que conduzam de maneira correta à diferenciação dessas e do uso de inúmeros fatores de crescimento, busca-se substituir tecidos ou órgãos do corpo humano que foram lesados ou perdidos e que atualmente ainda não podem ser repostos (CASAGRANDE et al., 2011).

Dentro desse contexto, três estratégias vêm sendo adotadas para a criação de novos tecidos: isolamento ou substituição de células, que permitiria a substituição de células específicas para suprir uma determinada função; uso de moléculas sinalizadoras; e, matrizes onde as células seriam depositadas. Apesar de ser uma área com infinitas possibilidades de aplicações, a engenharia de tecidos ainda apresenta inúmeros desafios para que seja implantada como rotina de tratamento dentro da clínica médica e, principalmente, odontológica.

A engenharia tecidual na Odontologia vem sendo estudada com o objetivo de constituir-se como uma nova modalidade de tratamento. Duailibi et al., em 2008, demonstraram que células do germe dentário de camundongos implantadas na mandíbula desses animais foram capazes de originar um órgão dental contendo dentina, esmalte, polpa e ligamento periodontal. Embora seja empolgante a ideia de se criar estruturas dentais em sua totalidade, ainda faltam estudos para se controlar o tamanho e a morfologia desejada. Dessa forma, a engenharia de cada componente tecidual do dente, feita de maneira isolada, parece ser uma estratégia mais próxima da realidade atual (CORDEIRO et al., 2008). Dentro desse contexto, a engenharia do tecido pulpar visa à substituição da polpa dentária inflamada ou necrótica por um tecido que seria capaz de produzir e formar dentina (SAKAI et al., 2010).

O tratamento endodôntico convencional, embora eficaz no combate à infecção, visa o fechamento da cavidade pulpar na região mais apical, por meio de uma ponte de dentina, osteodentina ou cimento, porém nem sempre consegue promover a complementação total do desenvolvimento apical da raiz em dentes permanentes jovens. Independente de acontecer apicigênese (ou apicogênese) não há a complementação lateral das paredes dentinárias do canal radicular. Esses elementos dentais ficam mais susceptíveis a fraturas radiculares, pois a deposição lateral de dentina durante o desenvolvimento da raiz é completamente

interrompida, devido ao processo necrótico da polpa dental ou ao tratamento endodôntico. Esse fato resulta em dentes com paredes laterais finas e frágeis (ROSA et al., 2013; SAKAI et al., 2011). Dentro desse contexto, é importante ressaltar que o tecido pulpar apresenta células altamente especializadas, chamadas odontoblastos, que são responsáveis por produzir e participar da calcificação da matriz dentinária. Em caso de necrose da polpa, o processo de dentinogênese é interrompido devido à morte dos odontoblastos, os quais uma vez perdidos não podem ser repostos. Assim, a criação de um novo tecido similar à polpa, a partir do recrutamento de células-tronco, poderia potencialmente completar a formação lateral e vertical da raiz de dentes permanentes imaturos em estado necrótico e, assim, melhorar o prognóstico em longo prazo (NÖR, 2006).

5.1 Células-tronco

Células-tronco são células indiferenciadas que possuem a capacidade de se diferenciar em uma ou mais linhagens celulares distintas. Para que uma célula seja classificada como célula-tronco é necessário que ela apresente três propriedades: auto-renovação, habilidade de se diferenciar em mais de um tipo celular e potencial para gerar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (SCHWINDT et al., 2005). Devido à sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, essas células possuem grande utilidade dentro do campo da engenharia de tecidos. Entretanto, alguns desafios ainda persistem no que diz respeito a utilizar esses tipos celulares clinicamente, pois ainda não existem metodologias adequadas para se adquirir e induzir a proliferação e diferenciação de uma fonte celular específica. Além disso, é necessário criar meios de manter essas células vivas e remover células que não são necessárias para a bioengenharia de tecidos (HORST et al., 2012).

A diferenciação de células-tronco sempre foi vista como sendo unidirecional e irreversível. Porém essa noção vem sendo confrontada através de evidências que demonstraram a plasticidade ou conversão de linhagens entre células-tronco adultas (CTA). Os mecanismos responsáveis por essa característica incluem a transdiferenciação, definida pela capacidade de conversão de uma célula de uma linhagem tecidual em outra linhagem completamente diferente, inclusive com a perda e ganho de função e de marcadores teciduais específicos. Mecanismos alternativos como as fusões entre células-tronco e células teciduais específicas ou então a habilidade das células-tronco em voltar a ser menos diferenciadas e depois se diferenciarem em outra linhagem também poderiam explicar essa aparente plasticidade das células-tronco (FORTIER, 2005; VATS et al., 2005).

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com seu potencial (toti, pluri e multipotentes) ou em relação à sua fonte (embrionária, pós-natal e adulta). As células-tronco totipotentes são capazes de se diferenciarem em qualquer tipo celular possuindo a habilidade de originar tecidos embrionários e extra-embrionários, tais como o zigoto. As classificadas como pluripotentes, provenientes da massa interna do blastocisto, podem formar qualquer tipo celular do embrião, porém não tecidos extra-embrionários. As células multipotentes são mais especializadas, contudo ainda apresentam a capacidade de originar um subgrupo de linhagens celulares. Dentro desse conceito, é importante diferenciar células-tronco de células progenitoras. Estas últimas possuem auto-renovação e potencialidade limitadas e são representadas pelas células oligopotentes, que geram linhagens celulares mais restritas que as multipotentes, e as onipotentes, que dão origem apenas a um tipo celular maduro (SCHWINDT et al., 2005).

Quando classificadas de acordo com a sua fonte, as células-tronco podem ser divididas em células de origem embrionária (CTE), as quais são isoladas da massa interna do blastocisto (MIB), cinco dias após a fertilização. Essas células apresentam a vantagem de se dividir indefinidamente *in vitro*, contudo é necessário o controle da diferenciação através do uso de fatores específicos, tornando este o principal desafio da terapia com CTE (SCHWINDT et al., 2005).

Horst et al., em 2012, afirmam que, num ambiente apropriado, essas células podem adquirir marcadores específicos em seu DNA que modulam sua expressão gênica, permitindo que CTE se diferenciem em qualquer tipo celular especializado. Fortier, em 2005, afirma que a diferenciação precoce de CTE é comum e vários esforços estão sendo feitos para preservar a indiferenciação dessas células. Além disso, o autor cita a dificuldade de se obter e manter CTE em meios de cultura. A MIB precisa, primeiramente, ser isolada do trofoblasto. Isso pode ser feito a partir da microdissecção física ou através da imunodissecação que lisam as células do trofoblasto, porém mantêm as células da MIB. CTE são derivadas da MIB e mantidas por “*feeder cells*” as quais são geralmente derivadas de embriões de camundongos e tratadas quimicamente antes do seu uso, impedindo assim sua replicação, porém mantendo a síntese de proteínas necessárias para a sobrevivência das CTE. O estudo também afirma que várias investigações estão sendo feitas com o objetivo de desenvolver protocolos alternativos de manutenção de CTE visto que o uso de “*feeder cells*” é altamente caro, trabalhoso e perigoso (devido à associação de células de origem animal com tecidos humanos). Há também o conhecimento de que “*feeder cells*” podem ser encontradas em outras fontes, tais

como a placenta humana e outros tecidos. Além disso, há a possibilidade de se cultivar CTE em um ambiente livre de “*feeder cells*” e contendo colágeno, laminina ou fibronectina (FORTIER, 2005). Embora possuam alta capacidade de diferenciação e se apresentem altamente atrativas para o campo da engenharia de tecidos, a utilização de CTE é controversa devido a problemas legais e éticos, tornando seu uso restrito em atividades laboratoriais e clínicas.

Existem também as células-tronco pós-natais que não se diferenciam espontaneamente, estão em abundância no organismo em desenvolvimento e possuem maior potencial de auto-renovação. Esse tipo celular pode, por exemplo, ser encontrado no cordão umbilical de recém-nascidos (SCHWINDT et al., 2005).

Por último, existem as células-tronco adultas (CTA) que, ao contrário das embrionárias, não apresentam auto-renovação por longos períodos, porém possuem a vantagem de ter sua capacidade de diferenciação controlada através do uso de fatores de crescimento apropriados ou outros sinais externos (SCHWINDT et al., 2005). As CTA estão presentes em diversos tecidos e apresentam potencial de renovação limitado às linhagens celulares do tecido na qual estão inseridas.

O uso de células-tronco na prática clínica depende da taxa de proliferação, potencial de diferenciação e acessibilidade a elas, assim sendo, a descoberta de células-tronco na polpa dental, tornou-se uma alternativa interessante à engenharia de tecidos (CASAGRANDE et al., 2011). Esses tipos celulares possuem a capacidade de se diferenciar em inúmeros tipos, tais como odontoblastos, adipócitos, células neurônio-*like*, osteoblasto, condrócito, melanócito e células endoteliais (PONNAIYAN, 2014). Zhang et al., em 2016, demonstraram, por exemplo, o potencial de diferenciação neurogênico de SHED. Os autores indicam que diversos estudos já afirmaram que DPSC são originadas de tecido de origem neuroectodérmica e que as mesmas contêm um conjunto de células progenitoras que podem se diferenciar em neurônios maduros sob condições especiais. A partir dessas evidências, os autores demonstraram que, após a utilização de um protocolo composto por dois meios de diferenciação diferentes, SHED expressaram marcadores de diferenciação neuronal e aparência de células neurônio-*like* (ZHANG et al., 2016).

Outro fator importante em relação às células-tronco é a variedade de fontes em que podemos encontrá-las já que estão presentes na polpa de dentes permanentes (DPSC) e decíduos (SHED), no ligamento periodontal (PDLSC) e na papila apical (SCAP). Aliado a

isso, as células-tronco da polpa dental possuem o potencial de se auto-renovarem em múltiplas linhagens de células e poderem ser isoladas de pacientes com pouca morbidade. SHED também são de fácil obtenção e apresentam uma taxa de proliferação mais elevada quando comparadas com DPSC, fato que facilitaria a expansão dessas células *in vitro* (CORDEIRO et al., 2008).

5.2 Arcabouços

Além do conhecimento a respeito das possibilidades advindas das células-tronco na prática clínica, é necessário entender, também, o efeito do microambiente no qual as células estão inseridas sobre seu potencial de diferenciação. Arcabouços são estruturas tridimensionais utilizadas para dar suporte às células e forma aos tecidos a serem gerados. Eles proveem o ambiente necessário para adesão, proliferação, migração e diferenciação das células-tronco até que elas passem a ter a capacidade de secretar seu próprio microambiente (CASAGRANDE et al., 2011).

Cordeiro et al., em 2008, desenvolveram um modelo de arcabouço associado a fatias de dentes humanos. Esse modelo permitiu a geração de um tecido pulpar similar ao original, por meio da semeadura de SHED em arcabouços biodegradáveis de ácido poli-L-láctico (PLLA) formados nas cavidades pulpares das fatias dentais, os quais foram posteriormente implantados no subcutâneo do dorso de camundongos imunodeficientes. Sakai et al. (2011) afirmaram que a utilização desse modelo possibilitaria o entendimento dos mecanismos envolvidos na diferenciação das células-tronco da polpa dental em odontoblastos e células endoteliais e permitiria a manipulação gênica e a marcação dessas células previamente à implantação nos camundongos para se determinar os seus destinos (CASAGRANDE et al., 2011; SAKAI et al., 2010; BENTO et al., 2013; CORDEIRO et al., 2008).

Demarco et al., em 2010, avaliaram o impacto de arcabouços porosos na proliferação e diferenciação de DPSC. Foram utilizados PLLA, um polímero sintético frequentemente empregado na engenharia de tecidos, e gelatina, considerada um polímero natural, associada ao PLLA. Ambos foram produzidos dentro das câmaras pulpares de fatias de dentes. Essas amostras foram semeadas com DPSC e implantadas em camundongos imunodeficientes. Arcabouços modificados com esferas de gelatina, teoricamente, teriam a capacidade de combinar as vantagens de materiais sintéticos e naturais, porém, verificou-se que ambos apresentaram taxa de proliferação e fixação semelhante. Houve diferenças no perfil de

expressão gênica das DPSC no decorrer do estudo, fato que demonstra a importância da modificação das superfícies e propriedades físicas dos arcabouços no desenvolvimento da engenharia de tecidos.

Embora amplamente utilizado no estudo da engenharia de tecidos pulpaes, o modelo de arcabouço utilizando fatias de dentes não leva em consideração a verdadeira anatomia tridimensional do canal radicular. Enquanto a difusão de nutrientes e oxigênio parece ser suficiente para manter a vitalidade das células nesse modelo, o mesmo não é verdade levando-se em consideração a extensão total do canal radicular (ROSA et al., 2013).

Rosa et al., em 2013, testaram a viabilidade de arcabouços injetáveis (Puramatrix® e colágeno recombinante humano tipo I) para a engenharia de tecidos pulpaes usando SHED em toda a extensão do canal radicular em dentes pré-molares humanos. Observou-se que ambos os arcabouços foram capazes de manter a vitalidade das células e permitiu a expressão de marcadores de diferenciação de odontoblastos. O mesmo não ocorreu nos grupos que não apresentavam estrutura dental circundando as células, indicando que moléculas sinalizadoras derivadas da dentina são necessárias para que ocorra essa diferenciação (CASAGRANDE et al., 2010).

Cavalcanti et al., em 2013, estudaram o uso de um hidrogel (Puramatrix®) no âmbito da engenharia de tecidos e verificaram que DPSC são capazes de sobreviver e proliferar na sua presença. Esse dado sugere que o uso de hidrogéis na engenharia tecidual é vantajoso, pois, o Puramatrix® quando inserido na câmara pulpar, se auto-polimeriza formando um gel sólido capaz de suportar o crescimento celular e de se adaptar facilmente aos diferentes formatos do canal radicular. O estudo também demonstrou que o uso de Puramatrix® em conjunto com o modelo de fatias dentais permitiu a expressão de marcadores de diferenciação em odontoblastos (nesse estudo: DSSP e DMP-1).

Zhang et al., em 2006, afirmaram que o material a partir do qual são construídos os arcabouços é um componente importante para a regeneração de tecidos. Sendo assim, os autores propuseram comparar a eficácia de três arcabouços diferentes, semeados com DPSC, sobre a regeneração de tecidos duros similares à dentina. Nesse estudo, cada material foi avaliado *in vitro*, onde as DPSC foram semeadas sobre os materiais estudados submersos em meio α -MEM por quatro semanas e, em seguida, observadas em microscópio eletrônico de varredura e através de RT-PCR. Na avaliação *in vivo*, DPSC foram semeadas sobre os três arcabouços estudados e em duas densidades diferentes e, posteriormente, introduzidas no

dorso de camundongos imunodeficientes. Após seis e doze semanas, as amostras foram recuperadas e analisadas sob microscopia de luz e PCR. Os grupos controle eram compostos por cada um dos diferentes arcabouços sem a presença de DPSC.

A análise *in vitro* para os três materiais demonstrou a formação de estruturas similares ao colágeno após quatro semanas. A matriz extracelular (ECM) calcificada apresentava nódulos mineralizados e a expressão de DSPP foi observada em todos os arcabouços estudados e semeados com DPSC. A análise *in vivo* do primeiro material utilizado (colágeno do tipo I) demonstrou que, tanto o grupo controle quanto as amostras removidas após seis semanas, estavam envoltas por uma fina camada fibrosa e que uma nova ECM havia se formado nas amostras semeadas com uma maior densidade de DPSC. Esporadicamente, era possível observar células sanguíneas na periferia das amostras. A quantidade de células observadas e de ECM era menor nos grupos semeados com menor quantidade de DPSC (ZHANG et al., 2006).

Ainda nesse estudo, as amostras recuperadas após doze semanas apresentaram todos os implantes envoltos por uma cápsula composta por fibroblastos. Os grupos semeados com uma maior quantidade de DPSC produziram ECM capaz de preencher totalmente a porosidade do arcabouço e, além disso, possuíram uma melhor organização comparada ao grupo removido após seis semanas. Também foi observada a presença de capilares ocupando a porção central das amostras. Nenhum tecido mineralizado foi observado, porém a expressão de DSPP foi confirmada através de RT-PCR nas amostras semeadas com DPSC. Os autores sugeriram o uso do colágeno por ser o componente predominante na matriz dentinária e da polpa dental e concluíram que esse tipo de material é altamente biocompatível. O aspecto histológico das matrizes semeadas com DPSC sugere que o colágeno permite a proliferação das DPSC, *in vivo*, e a detecção de DSPP a partir de imuno-histoquímica indica que o colágeno permitiu a diferenciação de DPSC em células odontoblastos-like (ZHANG et al., 2006).

O segundo material utilizado no estudo foram discos de cerâmica contendo hidroxiapatita e fosfato tricálcio (HA/TCP). As amostras removidas após seis semanas apresentaram-se envoltas por uma cápsula fibrosa de aproximadamente dez camadas de células e formato semelhante à superfície externa do material. Além disso, foi observado o preenchimento de todos os macroporos do arcabouço por tecido mole. Células e vasos sanguíneos foram encontrados na porção mais interna das amostras. Na porção central, havia

células distribuídas de forma irregular e que formaram ECM desorganizada. Contudo, na periferia foi observada uma ECM com aparência mais fibrosa. Não houve diferença entre os grupos semeados com maior ou menor quantidade de DPSC. As amostras recuperadas após doze semanas apresentaram uma ECM mais densa e alguns depósitos minerais foram observados. A expressão de DSPP foi identificada em todos os grupos. Os autores sugerem que as fibras colágenas e as múltiplas camadas de células encontradas indicam uma fase inicial de formação de tecido mineralizado. O estudo também afirma que um dos problemas do uso do pó de cerâmica são suas propriedades mecânicas, restringindo seu emprego para a regeneração de tecido duro. Por esse motivo, os autores optaram por utilizar cerâmica HA/TCP porosa. A quantidade limitada de tecido mineralizado formada nesse estudo é mais similar a tecido ósseo com células presas dentro da matriz calcificada do que com o complexo dentina-polpa (ZHANG et al., 2006).

Por último, esses autores estudaram um material feito de titânio. O estudo afirma que esse material foi capaz de suportar a diferenciação de DPSC e induzir a formação de nódulos calcificados, *in vitro*. Além disso, os autores sustentam a ideia de utilizar titânio a partir de estudos prévios, nos quais esse material permitiu a formação de tecido ósseo em arcabouços semeados com células osteogênicas da medula óssea de camundongos. As amostras removidas após seis e doze semanas apresentaram uma camada fibrosa ao redor delas, porém mais fina do que as encontradas nos arcabouços de cerâmica. Foi detectado tecido mole com abundância de vasos sanguíneos entre as fibras de titânio nas amostras de doze semanas. Nenhuma amostra apresentou a formação de tecido mineralizado, porém DSPP foi detectada nos grupos semeados com DPSC. No presente estudo, a calcificação da ECM foi observada apenas no experimento *in vitro*, não havendo formação visível de tecido mineralizado *in vivo* (ZHANG et al., 2006).

Kim et al., em 2009, afirmaram que a seleção do arcabouço ideal é determinada pela interação entre célula e arcabouço, a qual irá afetar diretamente a adesão, proliferação e diferenciação celular. Dentro desse contexto, os autores se propuseram a estudar o comportamento *in vitro* de três arcabouços naturais diferentes, colágeno (tipo I e III), gelatina e quitosana, e suas propriedades em relação à adesão celular, crescimento e diferenciação em cada um desses materiais. Para avaliar a citocompatibilidade das células com os arcabouços, os autores semearam células da polpa dental (HDPC) em cada um dos materiais estudados e as analisaram após 20 dias. Foi observado que mais células se aderiram ao colágeno (tanto I quanto o III) do que à quitosana ou à gelatina. Em relação ao crescimento celular em cada

arcabouço, notou-se que não havia diferenças entre o colágeno e a gelatina, contudo o quitosana mostrou menor capacidade de aumento no número de células, provavelmente devido à sua baixa capacidade hidrofílica.

Esses autores também mediram a atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP), a qual é considerada um marcador de início de diferenciação celular odontogênica. No colágeno I e III houve um aumento grande na atividade de ALP demonstrando, assim, a excelente capacidade do material em suportar a diferenciação e crescimento celular. Quitosana e gelatina apresentaram menor atividade de ALP quando comparado ao colágeno. O estudo também se propôs a investigar a mineralização da matriz extracelular (ECM) das HDPC e notou que quase não houve mineralização nas células semeadas em quitosana, o que já era esperado devido à sua baixa atividade de ALP e que a gelatina apresentava menos depósitos de cálcio que o colágeno. Segundo os autores, esses resultados indicam que células semeadas em quitosana não puderam responder apropriadamente a estímulos externos de diferenciação provenientes do experimento. Sendo assim, os pesquisadores concluem que, embora o monômero de quitosana tenha sido classificado como promotor de regeneração tecidual pulpar, o material sozinho não é um meio apropriado para a regeneração de dentina (KIM et al., 2009).

Por último, esses autores estudaram a expressão, pelas HDPC, de outras moléculas de diferenciação odontogênica, tais como osteocalcina (OCN), DSPP e DMP-1, quando semeadas nos diferentes arcabouços. Nessa parte do estudo, a quitosana não foi avaliada devido à sua interação com ALP. Foi observado que o padrão de expressão de OCN em meio colágeno (tanto I quanto III) foi intensa entre o décimo e décimo quinto dia e depois atenuada, enquanto que na gelatina, a expressão da mesma molécula foi aumentando gradativamente nos 20 dias. Em relação à DSPP e DMP-1, foi notado que o pico máximo de expressão dessas moléculas em meio colágeno foi no vigésimo dia, ou seja, após o de OCN. Na gelatina, foi observado que não houve expressão característica de nenhuma das moléculas supracitadas. Esse fato pode ser explicado, segundo os autores, pela ausência da estrutura tripla helicoidal na gelatina. A interação entre essa estrutura e as células pode ser importante para a produção de proteínas de mineralização da ECM. O artigo finaliza afirmando que é possível que arcabouços colágenos facilitem a mineralização, pois retêm proteínas não colagenosas e que isso não ocorre nos arcabouços feitos de gelatina (KIM et al., 2009).

5.3 Moléculas indutoras

Fatores de crescimento e fatores morfogênicos são proteínas que se ligam à membrana da célula e desencadeiam uma série de reações que coordenam diversas funções celulares. Os processos inicializados por elas determinam o destino da célula-tronco e regulam processos embrionários e fisiológicos. Esses mesmos fatores podem ser utilizados para guiar a diferenciação de células específicas e coordenar processos celulares dentro do campo da engenharia de tecidos. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), por exemplo, desempenha um importante papel na vasculogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e na angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos a partir de uma vasculatura pré-existente), em condições fisiológicas e patológicas (CASAGRANDE et al., 2011). Iohara et al., em 2008, demonstraram que células-tronco da polpa dental de suínos, na presença de VEGF, permitiram um aumento do fluxo sanguíneo em membros posteriores isquêmicos de camundongos através da secreção de fatores angiogênicos, como o VEGF, e da indução de respostas angiogênicas pelas células endoteliais do animal. Com isso, é possível considerar que uma maior disponibilidade de VEGF, associada ao uso de células-tronco, poderia favorecer o processo de regeneração ou engenharia de tecido pulpar.

Dentro dessa perspectiva de uso de fatores de crescimento para regeneração e engenharia tecidual, é importante ressaltar que a matriz dentinária (EMC) também apresenta diversos fatores de crescimento em seu conteúdo. Sendo assim, a ECM, secretada pelos odontoblastos possui em sua composição proteínas colágenas e não colágenas (NCP). Dentre as NCP, a sialofosfoproteína dentinária (DSPP) é a mais abundante delas. Quando processada, a DSPP dá origem a três formas distintas: sialoproteína dentinária (DSP), glicoproteína dentinária (DGP) e fosfoproteína dentinária (DPP), sendo que DSP e DPP possuem funções altamente importantes na dentinogênese e mutações em qualquer uma delas podem provocar dentinogênese imperfeita tipo II e III e displasia dentinária tipo II (WAN et al., 2016). Quando as moléculas da ECM são liberadas, se tornam bioativas e totalmente capazes de induzir respostas celulares, tais como geração de dentina terciária e reparos na polpa dental (CORDEIRO et al., 2008).

Também estão presentes na ECM as proteínas de matriz óssea (BMPs), as quais são capazes de desencadear uma série de eventos indutores de formação de dentina em modelos animais, e as proteínas da matriz dentinária (DMPs), que possuem a capacidade de sinalizar a produção de cristais de apatita e induzir a dentinogênese (CASAGRANDE et al., 2011).

Miura et al., em 2003, por exemplo, demonstraram que SHED tratadas com BMP-4, *in vitro*, foram capazes de regular a expressão de genes como CBFA1, Osterix e Osteocalcina, indicando que essas células são capazes de se diferenciar em células odontoblasto-like.

Por último, há a presença das sialoproteínas de osso (BSP), que estimulam a diferenciação de células que secretam matrizes mineralizadas em locais de exposição pulpar. A estimulação da dentina por diferentes fatores de crescimento resulta em características morfológicas distintas sugerindo que a seleção de indutores biológicos específicos possa induzir a reparação dentinária, de acordo com as necessidades do paciente (CASAGRANDE et al., 2011).

Tash et al., em 2014, estudaram o efeito de BMP-2 e BMP-7 como indutores de diferenciação odontogênica e osteogênica de células-tronco de germes dentais humanos (hTGSC). Nesse estudo, plasmídeos contendo BMP-2 e BMP-7 foram introduzidos em hTGSC cultivadas em seis placas diferentes através de eletroporação e, em seguida, essas células foram tratadas em meio propício à diferenciação odontogênica e osteogênica por 14 dias. A eletroporação consiste na emissão de pulsos elétricos que são responsáveis pela criação de poros na membrana celular e, assim, permitir a passagem dos plasmídeos. Os resultados foram comparados com o grupo controle positivo (PC) composto de hTGSC em meio de diferenciação (sem a presença de BMP-2 ou BMP-7) e com o grupo controle negativo (NC) composto apenas de hTGSC.

Para determinar se ocorreu ou não a diferenciação odontogênica e osteogênica, o nível de atividade da ALP foi mensurado pelos autores. O estudo demonstra que todos os grupos possuíram altos níveis de atividade de ALP com exceção do grupo NC. Além disso, as células transfectadas com BMP-2 e BMP-7 aumentaram a atividade de ALP significativamente quando comparado com o grupo PC. Através de imuno-histoquímica, os autores observaram que os grupos de células transfectadas com BMP-2 e BMP-7 e o grupo PC demonstraram a expressão significantemente maior (em relação ao grupo NC) de marcadores iniciais de diferenciação odontogênica e osteogênica, tais como COL1A, OCN, DSP, e também de BMP-2 e BMP-7. Os autores estudaram também a mineralização que aconteceu nos diferentes grupos e concluíram que o tratamento com BMP-2 ou BMP-7 induz a diferenciação odontogênica sem afetar a expressão de um ou de outro fator de crescimento, enquanto que, no processo de diferenciação osteogênica, uma BMP aumenta a expressão da outra (TASH et al., 2014).

Tabatabaei et al., em 2016, estudaram os efeitos de DMP, TGF- β 1 e fator de crescimento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) em DPSC cultivadas *in vitro*, para melhor entender o processo de reparação tecidual. Assim, os autores dividiram o estudo em duas fases. Na primeira, diferentes concentrações de DMP foram adicionadas à cultura. Na segunda fase, a concentração mais eficiente de DMP proveniente da fase um foi utilizada para analisar o comportamento das células na presença de TGF- β 1, PDGF-BB e sua combinação com DMP. As amostras foram divididas em dez grupos compostos por diferentes concentrações das moléculas supracitadas e analisadas após 24, 48 e 72 horas.

O estudo demonstrou que, na fase um não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de DMP em 24 e 48 horas, assim sendo, a melhor proliferação celular foi observada na presença de 250 ng/mL de DMP em 72 horas. Já as DMP em concentrações de 10 e 25 μ g/mL inibiram a proliferação celular. Segundo os autores, esse fato demonstra que extratos da matriz dentinária extracelular parecem aumentar a proliferação celular em pequenas concentrações enquanto que concentrações mais altas inibiam esse crescimento. Em relação à fase dois, o estudo demonstrou que DMP na presença de TGF- β 1 na concentração de 5 ng/mL apresentou uma maior viabilidade após 24 horas comparado ao grupo controle, porém nenhuma diferença significativa foi notada entre os mesmo grupos após 48 e 72 horas. Na combinação de 250 ng/mL de DMPs e 5 ng/mL de TGF- β 1 não houve mudanças na viabilidade celular após 24 e 48 horas, porém o mesmo não aconteceu após 72 horas, onde a mesma diminuiu. Com o passar do tempo, percebeu-se também que a diminuição da viabilidade celular (em torno de 20%), ao se comparar os grupos após 24 e 72 horas, indica que a taxa de proliferação celular diminuiu durante esse mesmo período para esse grupo (TABATABAEI et al., 2016).

Em relação às células cultivadas na presença de 5 ng/mL de PDGF-BB foi observada alta viabilidade nos três intervalos de tempo quando comparadas ao grupo controle, contudo a combinação de 5 ng/mL de PDGF-BB e 250 ng/mL de DMP não causou mudanças significativas após os espaços de tempo estudados. O estudo também cita que a combinação dos três fatores nas concentrações estudadas (5, 10 e 250 ng/mL) não causou mudanças significativas em comparação com o grupo controle em nenhum dos intervalos estudados (TABATABAEI et al., 2016).

Os autores notaram também que DPSC na presença de 10 ng/mL de TGF- β 1 demonstrou uma maior viabilidade após 24 horas comparado ao grupo controle, porém

nenhuma diferença foi notada após 48 e 72 horas. Ao se combinar 10 ng/mL de TGF- β 1 e 250 ng/mL também não houve diferenças significativas após 24 horas, porém após 48 e 72 horas ocorreu um declínio na viabilidade celular. Por outro lado, a redução da viabilidade celular quando comparados os períodos de 72 e 24 horas indica que a taxa de proliferação celular diminuiu nesse grupo (TABATABAEI et al., 2016).

O perfil de viabilidade celular nos grupos semeados com 5 e 10 ng/mL de PDGF-BB foram praticamente idênticos. Indo mais além, na concentração de 10 ng/mL um aumento significativo na viabilidade celular foi notado nos três períodos estudados quando comparados com o grupo controle. Por último, o estudo afirma que quando combinados os três fatores nas concentrações citadas, ocorreu um aumento significativo na viabilidade celular. Os autores confirmam assim, o efeito antagônico de algumas combinações (DMP + TGF- β 1) e o efeito sinérgico de outras combinações (DMP + TGF- β 1 + PDGF-BB) (TABATABAEI et al., 2016).

5.4 Estudos com modelos de engenharia de tecido pulpar

Cordeiro et al., em 2008, desenvolveram um modelo de engenharia de tecido conjuntivo altamente vascularizado com características arquitetônicas e histológicas semelhantes às encontradas na polpa humana. Para tanto, SHED foram semeadas em conjuntos de fatia dental/arcabouço, associadas ou não com células endoteliais da microvasculatura da derme humana (HDMEC) e implantadas no subcutâneo do dorso de camundongos imunodeficientes. Após 14 a 28 dias, as amostras foram removidas e verificou-se a formação de um tecido morfológicamente semelhante à polpa dental humana nos grupos semeados com SHED ou SHED+HDMEC. Observou-se a presença de uma camada celular que lembrava a camada odontoblástica, onde as células expressavam DSPP (o qual é um marcador de odontoblastos maduros). As células também possuíam polarização do núcleo, presença de junções do tipo *gap* e retículo endoplasmático bem desenvolvido, características estas de células secretoras, como são os odontoblastos. Embora outros tipos celulares façam expressão de DSPP, a alta quantidade desse marcador expressa na amostra e as características histológicas verificadas levaram os autores a concluir que as SHED foram capazes de se diferenciar em células tipo odontoblastos. Nesse estudo, a transfecção das SHED com o vetor LacZ permitiu detectar a capacidade das SHED em se diferenciarem em células endoteliais e formar uma rede microvascular anastomosada com a vasculatura do camundongo. Esse achado, além de gerar possibilidades para o tratamento de doenças isquêmicas, é altamente

relevante no sucesso de terapias utilizando a engenharia de tecidos visto que, um dos grandes desafios dessa área é o rápido estabelecimento de uma rede microvascular que permita a sobrevivência das células transplantadas através do influxo de nutrientes e oxigênio necessários para o processo de regeneração tecidual (CORDEIRO et al., 2008; CASAGRANDE et al., 2011).

Casagrande et al., em 2010, demonstraram que sinais morfogênicos derivados da dentina, particularmente a BMP-2, são necessários e suficientes para induzir a diferenciação de células-tronco em odontoblastos. O estudo analisou SHED semeadas em PLLA presente em quatro condições diferentes: sem a presença de cortes de dente, em cortes de dente não tratados ou tratados com hipoclorito de sódio (NaOCl) ou EDTA e que foram cultivadas *in vitro* por 28 dias. Alternadamente, amostras de cortes de dente semeadas com SHED foram implantadas no subcutâneo de camundongos imunodeficientes.

O estudo observou que SHED semeadas em arcabouços sem dentina ou com dentina desmineralizada (através do uso de NaOCl) não apresentavam marcadores de diferenciação em odontoblastos (DSPP, DMP-1 e MEPE). Os autores também notaram que após a fase inicial de crescimento, a qual ocorre entre o primeiro e 14º dia do estudo, a proliferação de SHED semeada em arcabouços com a presença de dentina era inibida, o que não ocorria nos grupos em que a dentina estava ausente ou desmineralizada. Esse dado sugere que, a ausência de proteínas dentinárias faz com que as SHED não se diferenciem em odontoblastos. Os experimentos *in vitro* demonstraram, também, que SHED cultivadas no grupo não tratado ou tratado com EDTA expressaram marcadores de diferenciação em odontoblastos a partir do 14º dia e que nas condições *in vivo*, após 28 dias, era clara a detecção dos três marcadores em questão (CASAGRANDE et al., 2010).

Em contrapartida, os grupos tratados com NaOCl ou sem a presença da estrutura dentinária não apresentaram os marcadores durante todo o estudo. Foi hipotetizado, então, que o ácido lático liberado pela degradação do PLLA ligou-se a dentina, fato que facilitou a liberação dos morfógenos dentinários e conseqüente diferenciação das SHED. Além disso, no grupo tratado com EDTA, houve maior expressão dos marcadores de diferenciação em odontoblastos quando comparado ao grupo de fatia de dente não tratada. É possível que indutores de diferenciação de odontoblastos provenientes da dentina, incluindo BMP-2, sejam mobilizados pelo EDTA permitindo a expressão dos marcadores nas SHED (CASAGRANDE et al., 2010).

A análise coletiva desses dados sugere que o uso do EDTA pode ser benéfico à terapia endodôntica regenerativa. Por último, o estudo observou que SHED expressou níveis significantes de receptores de BMP e que, quando estimuladas, as células responderam melhor a BMP-2 do que a BMP-7. Para descobrir o papel específico de cada uma das duas BMP na diferenciação das SHED, os autores utilizaram anticorpos neutralizantes e notaram que BMP-2 (e não BMP-7) é requerida para a diferenciação em odontoblastos sob as condições do experimento (CASAGRANDE et al., 2010).

Sakai et al., em 2010, estudaram a combinação de métodos *in vitro* e *in vivo* para avaliar se as SHED são capazes de se diferenciar em odontoblastos funcionais (formadores de dentina) e células endoteliais. O tecido gerado nesse estudo possuía características semelhantes à dentina, incluindo a presença de túbulos dentinários. Observou-se que as SHED se diferenciaram em células que secretam matriz dentinária em um ritmo mais acelerado comparado com o grupo controle (fatias de dentes com tecido pulpar original). Os autores sugerem que isso se deve às diferentes fases do ciclo celular e que as células diferenciadas a partir de SHED são mais jovens e, conseqüentemente, com maior atividade secretora.

Nesse estudo SHED também foram semeadas na presença de VEGF e, após 28 dias, todos os marcadores para diferenciação endotelial avaliados no estudo foram expressos. Outro ponto que os autores observaram foi que as SHED expressavam continuamente receptores para VEGF (VEGFR1 e NP-1). Quando o VEGFR1 foi silenciado, verificou-se uma inibição na formação de capilares a partir de SHED, mas não houve efeito na proliferação celular. Em contrapartida, quando NP-1 foi silenciado não houve alterações na capacidade de formação dos capilares ou na proliferação celular. VEGF também inibiu a fosforilação do sinalizador de tradução e ativação da transcrição (STAT 3), considerada indicativo de indiferenciação, e induziu a expressão de sinalizador de regulação extra celular (ERK) e proteína quinase B (AKT), que possuem importantes papéis na diferenciação de células endoteliais. A análise desses dados sugere que VEGF induz eventos sinalizadores na SHED que são consistentes com o processo de diferenciação celular endotelial (SAKAI et al., 2010).

Prescott et al., em 2008, acreditam que uma potencial aplicação da engenharia tecidual pulpar é nos casos de reparação de perfurações endodônticas e, por isso, estudaram a geração de um novo tecido através do uso de DPSC, um arcabouço colágeno e DMP1. Os autores acreditam que apesar do MTA ser um ótimo material para reparos de perfurações radiculares, ele não se degrada e conseqüentemente não permite o surgimento de tecido natural para

substituí-lo. Por esse motivo foi escolhido um arcabouço colágeno. Nesse estudo, fatias de dentes advindas de terceiros molares humanos foram perfuradas e divididas em cinco grupos aleatoriamente. Posteriormente, as amostras foram implantadas no subcutâneo de camundongos imunodeficientes. Após seis semanas o animal foi morto e as fatias analisadas.

Os resultados indicaram que o grupo um (semeado apenas com MTA) se manteve igual ao início do estudo. O grupo dois, onde as fatias de dentes foram semeadas apenas com arcabouço de origem colágena, observou-se processo de degradação do mesmo e nenhum tecido de substituição foi identificado. O grupo três (constituído por arcabouço colágeno semeado com DMP1) apresentou um grande número de células viáveis e também formação de matriz colágena periférica. Porém, nenhuma deposição de matriz foi observada no centro da fatia. O quarto grupo, semeado com DPSC, DMP1 sobre um arcabouço colágeno, demonstrou fortes evidências de regeneração tecidual. Também foi observado que células aparentemente fibroblásticas e endoteliais iniciaram a deposição de uma nova matriz, visto que o arcabouço colágeno havia degradado. Vasos sanguíneos e matriz colágena puderam ser visualizados por toda a região da perfuração onde também foi observada a presença de proliferação celular indicando reparação tecidual. Finalmente no grupo cinco, caracterizado pela presença do arcabouço, porém semeado apenas com DPSC, os resultados foram similares ao grupo dois (PRESCOTT et al., 2008).

Os autores concluíram que nos grupos três e cinco, em que um dos componentes da tríade da engenharia tecidual estava faltando (DPSC e DMP1 respectivamente) não havia organização suficiente para apontar crescimento tecidual. No grupo quatro, os três componentes da tríade estavam presentes e por esse motivo foi identificada uma organização tecidual e formação de nova matriz colágena. Não houve formação de tecido duro, porém isso não era esperado em apenas seis semanas. Os autores justificaram o uso de DMP1, pois já havia sido demonstrado que essa molécula induziu a diferenciação de células-tronco em células odontoblasto-like e estimulado a formação de tecido mineralizado. Por fim, os autores confirmaram o potencial uso do grupo 4 (DPSC, colágeno e DMP1) na reparação tecidual, com o objetivo maior de criar tecido mineralizado em áreas de perfuração (PRESCOTT et al., 2008).

Nosrat et al., em 2014, analisaram o protocolo de endodontia regenerativa para dentes imaturos com polpa necrótica publicado pela *American Association of Endodontists* (AAE) e seus possíveis resultados. Segundo os autores, o uso Hidróxido de Cálcio utilizado no

tratamento endodôntico atual é amplamente difundido e seus resultados altamente previsíveis, porém seu uso apresenta diversas desvantagens tais como múltiplas idas ao dentista. Além disso, há um maior risco de recontaminação do canal devido a um selamento mal realizado. O protocolo sugerido pela AAE possui três passos e é baseado na presença de SCAP, as quais são a fonte primária de odontoblastos no desenvolvimento normal da raiz.

O primeiro passo do protocolo consiste na desinfecção do canal com hipoclorito de sódio 1,5%. Em seguida, aplica-se uma pasta composta de três antibióticos (TAP) ou de Hidróxido de Cálcio para controlar os sintomas agudos do paciente e atingir um grau maior de desinfecção. Os antibióticos mais utilizados para o preparo da TAP são o Metronidazol, Minociclina e Ciprofloxacina e seu uso como medicamento intracanal é associado com um aumento significativo de desinfecção quando comparado ao hidróxido de cálcio. No entanto, os autores também citam alguns resultados desfavoráveis dessa técnica, tal como a descoloração do dente, muito provavelmente causada pela Minociclina presente na TAP ou pelo MTA. A solução para esses problemas estaria no uso da pasta dupla de antibióticos e no uso de CEM para selamento dos canais. (NOSRAT et al., 2014).

O segundo passo envolve a remoção da medicação, irrigação final com EDTA e a indução de um coágulo sanguíneo dentro do canal radicular através da utilização de uma lima endodôntica sobre-extendida sobre os tecidos periapicais. O uso de EDTA é justificado, pois ele é responsável pela liberação de fatores de crescimento presentes nas paredes dentinárias que promoverão a proliferação e diferenciação das SCAP. O coágulo sanguíneo produzido pelas limas endodônticas sobre-extendidas atuaria como um arcabouço rico em proteínas e também levaria SCAP até o canal radicular (NOSRAT et al., 2014).

O terceiro e último passo seria o selamento do canal com um material biocompatível seguido da restauração da cavidade de acesso. O material mais indicado é o MTA embora os autores afirmem que o uso de cimento rico em cálcio (CEM) também pode ser utilizado de maneira satisfatória. O artigo afirma que diversos estudos já apontaram o crescimento no comprimento e na largura radicular após o uso desse protocolo, porém alguns resultados desfavoráveis foram observados, como a ausência ou crescimento radicular insatisfatório pela falta de instrumentação do canal o que dificultaria a remoção de bactérias firmemente aderidas às paredes dentinárias ou então pelo dano causado às SCAP devido à infecção periapical de longa duração. Por último os autores citam a ausência de regeneração tecidual no comprimento do canal a qual não pode ser considerado falha clínica, pois os critérios para

determinar o sucesso do tratamento não foram estabelecidos ainda. Porém esse dado demonstra que os resultados advindos do protocolo de atendimento da AAE podem ser imprevisíveis (NOSRAT et al., 2014).

Ravindran et al., em 2014, demonstraram o potencial de diferenciação odontogênica de DPSC, PDLSC e da medula óssea (HMSC). Os autores justificam o uso de células advindas de outras fontes, que não a de dentes permanentes, pois as DPSC em adultos são limitadas a terceiros molares previamente extraídos. Os autores avaliaram, então, o comportamento das DPSC, PDLSC e HMSC quando semeadas em um arcabouço que mimetiza a matriz extracelular presente na polpa dentária.

No experimento *in vitro*, os três tipos celulares foram semeados com o arcabouço descrito anteriormente e analisados após 24 horas, uma e duas semanas. Verificou-se que, após esses períodos, todos os grupos celulares estudados apresentaram mais de 98% de células vivas. Também notou-se, através de microscopia eletrônica, que todos os tipos celulares demonstraram interação com o arcabouço utilizado. Os autores concluem que tanto DPSC, quanto PDLSC e HMSC sobrevivem, aderem e interagem com o ambiente fora da célula quando semeadas em arcabouços que mimetizam a matriz extracelular. Utilizando PCR, o estudo analisou a expressão de diferentes moléculas que podem indicar diferenciação odontogênica de HMSC. Quando cultivadas no arcabouço em questão, essas células apresentaram expressão de marcadores como Runx2, OCN e colágeno do tipo I, porém para a expressão de DSPP seria necessário maior tempo de estudo. Além disso, também houve a expressão de fatores de crescimento como TGF β 1, FGF-1, VEGF e GDF10 (RAVIDRAN et al., 2014).

Para o experimento *in vivo*, esses autores implantaram os três tipos celulares combinados com arcabouços diferentes no subcutâneo de camundongos imunocomprometidos por quatro semanas. Os arcabouços possuíam diferentes propriedades, podendo eles ser compostos de colágeno/quitosana, ECM propriamente dito, ECM onde há o bloqueio de DPP e ECM onde há o bloqueio de IgG. Após análise imuno-histoquímica, foi observado que as amostras semeadas com PDLSC e DPSC no grupo controle (composto de arcabouços colágeno/quitosana) não demonstraram níveis detectáveis de DSP, DPP e VEGF; entretanto nos grupos semeados sobre o arcabouço que mimetiza a matriz extracelular pulpar a expressão dessas proteínas foi detectada. A análise imuno-histoquímica das amostras semeadas com HMSCs demonstrou a expressão de DSP e DPP quando combinadas com

ECM semelhante à polpa dental. Também houve um aumento na expressão de DMP1, VEGF e da vascularização nessas amostras (RAVIDRAN et al., 2014).

O estudo também analisou a deposição de cálcio nos arcabouços estudados e notou que, nas amostras semeadas sobre ECM, ocorreu o aumento de depósitos de cálcio quando comparado ao grupo controle. Nas amostras de DPSC semeadas sobre o arcabouço onde há o bloqueio de DPP também houve aumento no número de depósitos de cálcio, porém em menor quantidade quando comparado ao grupo semeado sobre ECM propriamente dita (RAVIDRAN et al., 2014).

Finalmente, os autores estudaram a indução de vascularização sobre os arcabouços. Notou-se que, no grupo controle, células endoteliais estavam presentes na periferia das amostras semeadas com os três tipos celulares. Os grupos semeados sobre ECM semelhante à polpa dental apresentaram maior quantidade de células endoteliais na periferia e por toda a matriz extracelular, fato esse último, não observado no grupo controle. Esse fato, segundo os autores, sugere que ECM semelhante à polpa dental possui a capacidade de induzir vascularização independente do tipo celular mesenquimal presente nele (RAVIDRAN et al., 2014).

Por fim, o estudo conclui que ECM biomimética à polpa dental e DPSC possibilitam a regeneração de um tecido pulpar que expressa DSP, DPP e DMP1. Além disso, os três tipos celulares estudados demonstraram excelente viabilidade e proliferação quando semeados sobre esse mesmo arcabouço. Os autores observaram que os três tipos celulares estudados caminham em direção ao mesmo objetivo, pois apresentam o mesmo potencial de diferenciação em diversas linhagens, porém esses tipos celulares respondem de maneira diferente aos estímulos provenientes do meio. Por último, o artigo conclui que ECM semelhante à polpa dental provém uma alternativa viável de arcabouço para a engenharia de tecido pulpar humano (RAVIDRAN et al., 2014).

6. DISCUSSÃO

Os estudos feitos dentro do campo da engenharia de tecidos podem consolidar uma nova forma de tratamento dentro da clínica odontológica. A ideia de se criar a estrutura dental em sua totalidade a partir de células-tronco vêm sendo amplamente estudada na literatura. Duailibi et al., em 2008, demonstraram a formação de um complexo dental contendo dentina, esmalte, polpa e ligamento periodontal utilizando camundongos imunossuprimidos, contudo, por envolver inúmeras moléculas de sinalização, células-tronco e arcabouços, a criação de um elemento dental em sua totalidade é altamente complexa. Por essa razão, Cordeiro et al., em 2008, estudaram o desenvolvimento de partes da estrutura dental, como por exemplo, a polpa dentária. Em seu estudo, foi formulado um protótipo de arcabouço, capaz de estimular a diferenciação de SHED em células odontoblastos-*like*, utilizando fatias de dentes implantadas no dorso de camundongos imunossuprimidos.

Para se estudar a engenharia de tecidos são necessários conhecimentos biológicos, clínicos e de engenharia. Além disso, por ser composta de um tripé (células-tronco, arcabouços e inúmeros fatores de crescimento), também se faz necessário o conhecimento prévio de cada um desses fatores.

O primeiro deles, as células-tronco, é capaz de se diferenciar em linhagens celulares distintas e possuem diversas classificações, porém a mais aceita classifica essas células de acordo com a sua fonte em embrionárias, pós-natais e adultas ou de acordo com o seu potencial em toti, pluri ou multipotentes (SCHWINDT et al., 2005). Os mesmos autores salientam que as células-tronco de origem embrionária possuem alta capacidade de diferenciação e, por isso, são altamente atrativas para a engenharia de tecidos, porém atualmente há um grande debate em torno de questões éticas e religiosas relacionadas a esse tipo celular.

O uso de embriões como fonte de células-tronco embrionárias faz com que diversos grupos sejam contra a ideia de seu uso no campo da engenharia de tecidos. Esses grupos possuem diferentes visões do que seria o início da vida e, para muitos deles, o simples uso de embriões a favor da ciência seria o fim de uma vida em potencial. Outro fator muito discutido em torno dessas células é a clonagem terapêutica. Essa técnica consiste em fusionar uma célula somática de um adulto com um óvulo sem núcleo com o objetivo de gerar um blastocisto que seria utilizado como fonte de células-tronco embrionárias. Embora pareça um procedimento novo, um processo semelhante já foi utilizado para a clonagem da ovelha Dolly,

com a única diferença que na clonagem terapêutica interrompe-se o desenvolvimento do embrião no quinto dia após a fertilização. Essa técnica ainda gera muita discussão, principalmente em torno da criação de “mercados negros” de embriões, porém sua utilização poderia eliminar problemas de rejeição que o tratamento utilizando essas células poderia gerar (SCHWINDT et al., 2005).

Por essa razão, novas fontes celulares vêm sendo estudadas. Casagrande et al., em 2011, relatam, por exemplo, que o uso de células-tronco advindas da polpa dental de dentes decíduos na engenharia tecidual pulpar é uma alternativa interessante devido sua taxa de proliferação, potencial de diferenciação e principalmente a acessibilidade a elas. Fica claro que, embora não possuam um potencial de diferenciação amplo como as CTE, as SHED vêm se afirmando como uma das opções mais viáveis dentro do campo da engenharia de tecidos, porém não única. Células-tronco da medula óssea, por exemplo, podem se diferenciar em múltiplas linhagens mesenquimais e por isso também podem ser consideradas como opção para a engenharia de tecidos. Essas células são conhecidas pela capacidade de originar osteoblastos, condrócitos, adipócitos e, nos últimos anos, seu potencial odontogênico vem sendo estudado. Li et al., em 2007, cultivaram BMSC juntamente com células do epitélio oral para estudar esse potencial odontogênico. Após um dia de cultura as células expressaram Pax-9, após o sexto dia foi detectada a expressão de DMP1 e finalmente, após doze dias, a presença de DSP foi observada. Segundo os autores, a sequência de expressão desses genes é consistente com o desenvolvimento de um dente. O estudo também pesquisou o potencial odontogênico das BMSC *in vivo*, transplantando o mesmo conjunto para a cápsula renal de camundongos. Após quatro semanas, as amostras foram recuperadas e foram observadas estruturas similares a dentes envoltas por osso e tecido mole. Esse estudo, juntamente com diversos outros, demonstra a possibilidade real de se obter células-tronco advindas das mais diferentes fontes celulares e aplica-las ao campo da engenharia de tecido pulpar ou não.

O uso de células-tronco no campo da engenharia de tecidos parece promissor, porém Vats et al., em 2005, discutem os potenciais desafios que ainda precisamos enfrentar para consolidar sua utilização na nossa rotina clínica. Os autores apontam, primeiramente, as dúvidas em relação à melhor maneira de se expandir essas células. Embora já existam trabalhos nessa área, ainda não é claro, por exemplo, qual a tecnologia e os processos de controle de qualidade que deverão ser empregados para que essa expansão ocorra. Em seguida, o estudo também cita a dificuldade de fazer com que as células-tronco cheguem ao tecido e/ou órgão que se deseja para que suas propriedades terapêuticas sejam

desempenhadas. Os autores afirmam que em determinadas situações a simples implantação das células no local indicado pode ser a solução, enquanto que em outros casos, seria necessária a utilização de arcabouços para que essas células possam desempenhas suas funções.

O segundo fator envolvido na engenharia tecidual, os arcabouços, são um dos grandes objetos de estudos dessa área, pois proveem o ambiente necessário para o crescimento e diferenciação celular. A primeira indagação em relação a eles é a maneira como diferentes materiais são utilizados para reproduzir esse microambiente. Langer & Vacanti, em 1993, afirmam que arcabouços feitos de materiais naturais apresentam a vantagem de conter informações, como uma sequência particular de aminoácidos, por exemplo, que facilitam a adesão e manutenção da diferenciação celular, enquanto que materiais sintéticos permitem um controle mais preciso do peso molecular, do tempo de degradação e outros atributos, porém podem não interagir com as células da maneira que desejamos.

Uma segunda indagação em relação a esses microambientes é a maneira que os diferentes arcabouços se apresentam. Cordeiro et al., em 2008, se propuseram a estudar um modelo de arcabouço composto de PLLA associado a fatias de dentes humanos e posteriormente implantados em camundongos imunodeficientes. Contudo, Rosa et al., em 2013, argumentaram que, embora, altamente importante para o desenvolvimento da engenharia de tecidos, era necessário um modelo que reproduzisse a anatomia verdadeira do canal. Ao analisarmos os resultados de ambos os artigos é possível afirmar que, independente do formato do arcabouço, a presença de moléculas sinalizadoras advindas da dentina, também são necessárias para que ocorra diferenciação celular.

Para que as células-tronco se proliferem e se diferenciem é necessária a presença de uma gama de moléculas, com expressão temporal e espacial determinantes, que serão responsáveis pelo aporte de nutrientes e pela criação de um meio propício a sua diferenciação. Casagrande et al., em 2011, salientou a importância do VEGF, responsável pela angiogênese e vasculogênese em condições de normalidade ou não. Indo mais além, Iohara et al., em 2008, demonstrou a importância do VEGF ao ser combinado a DPSC em suínos. Inúmeras outras moléculas como DSPP, BMPs, FGFs são extremamente importantes para a engenharia de tecidos, e o entendimento do papel de cada uma delas, se faz necessário para que a engenharia de tecidos faça parte do dia-a-dia de médicos e cirurgiões-dentistas. Casagrande et al. em 2010, por exemplo, demonstraram a importância de BMP-2 na diferenciação de SHED em

odontoblastos enquanto Tash et al., em 2014, estudaram o efeito de BMP-2 e BMP-4 na diferenciação odontogênica.

Os fatores que compõem o tripé da engenharia de tecidos, quando combinados, tornam possível a reconstrução de tecidos e órgãos que foram perdidos por doenças ou acidentes. Ainda hoje, diversas patologias possuem como única opção de tratamento definitivo o transplante do órgão afetado. Nesses casos, o paciente se vê obrigado a enfrentar longas e, algumas vezes, demoradas filas em busca de algum doador compatível com ele. Contudo, a engenharia tecidual vem se desenvolvendo nos últimos anos para que essa realidade mude. Espera-se que num futuro próximo seja possível a criação de órgãos em laboratório que poderão ser implantados nos pacientes em tempo mínimo, evitando assim a espera e o sofrimento causado pelas filas de transplantes. Além disso, para aqueles pacientes que sofreram acidentes que os limitaram de alguma maneira, seja física ou intelectual, a engenharia de tecidos pode ser o caminho rumo à recuperação.

Seguindo o mesmo raciocínio, a engenharia de tecidos também deve causar um impacto significativo no preço dos tratamentos médicos e odontológicos. Ao invés de tratarmos paliativamente um paciente que está na fila de transplantes há anos, poderíamos trata-lo definitivamente logo que for feito seu diagnóstico, poupando tempo e dinheiro não só do paciente, mas também do sistema de saúde do país em que vive. Em relação à Odontologia, a engenharia tecidual poderia diminuir o número de consultas do paciente, pois ao invés de próteses (as quais devem ser refeitas em determinados intervalos de tempo) ou tratamentos endodônticos (que necessitam diversas idas ao dentista) poderíamos entregar aos nossos pacientes dentes naturais e com tecido pulpar semelhante ao original, diminuindo os gastos não só para o paciente em longo prazo, mas também para o cirurgião-dentista que poderia otimizar seus procedimentos clínicos e, consequentemente, atender um maior número de pessoas.

Indo mais além, o cirurgião-dentista seria capaz de proporcionar aos seus pacientes um tratamento que devolva função e estética mais próxima possível da que eles possuíam no passado. Isso fica claro, por exemplo, na engenharia de tecido pulpar. O tratamento endodôntico é eficaz no tratamento de doenças do periápice e da dor que o paciente possa estar sentido, contudo não é capaz de devolver ao elemento dental a vitalidade que possuía antes do tratamento. A engenharia tecidual pulpar busca recriar a polpa dental para que esse dente volte a ser exatamente como era antes de começar a causar desconforto para o paciente.

O mesmo princípio seria aplicado no tratamento de canal de dentes jovens que apresentam rizogênese incompleta onde a engenharia de tecido pulpar poderia permitir o desenvolvimento normal da raiz após o tratamento endodôntico, fator que não é observado com os tratamentos atuais. Como já citado anteriormente, a terapia endodôntica convencional nesses dentes não permite o completo desenvolvimento vertical e lateral da raiz, afetando a longevidade desses casos. A engenharia de tecido pulpar poderá permitir que essa raiz continue se formando, melhorando consideravelmente o prognóstico desses elementos dentais.

Infelizmente a engenharia de tecido pulpar ainda não pode ser realizada em nossos consultórios, porém, com o rápido desenvolvimento da tecnologia e dos conhecimentos científicos, em breve ela será parte da nossa rotina clínica e caberá aos cirurgiões dentistas se adaptarem a uma nova maneira de exercer a Odontologia.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento endodôntico convencional de dentes permanentes jovens, embora eficaz no combate dos sinais e sintomas apresentados pelo paciente, não permite a completa deposição de dentina na raiz, resultado em dentes mais frágeis e com prognóstico sombrio. A engenharia de tecido se apresenta como alternativa para esses casos, tendo como objetivo a criação de um novo tecido pulpar dentro do canal radicular que permita o completo desenvolvimento da raiz e mantenha a vitalidade do elemento dental.

O entendimento dos fatores envolvidos na engenharia de tecidos é fundamental para o desenvolvimento da engenharia tecidual pulpar. Para isso, o estudo das diferentes fontes de células-tronco e seus potenciais, das diversas moléculas indutoras envolvidas no processo e dos diferentes tipos de arcabouços que permitam o desenvolvimento dessas células vêm sendo feitos.

Diversos autores vêm estudando cada um dos fatores que compõem o tripé da engenharia de tecidos e suas diferentes combinações. Os resultados desses estudos mostram que é possível a criação de um tecido pulpar semelhante ao original a partir de células-tronco de diversas fontes entre elas as de dentes permanentes e principalmente de dentes decíduos, as quais teriam a vantagem de serem facilmente obtidas. Contudo, é importante salientar que se precisa adquirir mais conhecimento no que diz respeito a limitação de crescimento dessas células, ao melhor tipo de arcabouço, no papel exato de cada uma das moléculas indutoras e quais realmente são necessárias para a engenharia de tecido pulpar. Outro obstáculo a ser enfrentado é a transição desses estudos feitos em laboratórios para a prática clínica, pois envolve questões éticas difíceis de serem tratadas.

Por fim, fica clara a importância dessa área de estudo e o impacto que poderá causar na maneira que a Odontologia é praticada atualmente, porém mais estudos são necessários para que a engenharia de tecido pulpar seja finalmente aplicada na rotina do consultório odontológico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALWATTAR, B.J.; SCHWARZKOPF, R.; KIRSCH, T. Stem cells in orthopedics and fracture healing. **Bull NYU Hosp Jt Dis**, v. 69, n. 1, p. 6-10, 2011.

BENTO, L. W. et al. Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ERK signaling. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 1, p. 51-57, out. 2013.

CASAGRANDE, L. et al. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 6, p. 603-608, jan. 2010.

CASAGRANDE, L. et al. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, v. 99, p. 1-7, nov. 2011.

CAVALCANTI, Bruno N.; ZEITLIN, Benjamin D.; NÖR, Jacques Eduardo. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. **Dental Materials**, v. 29, n. 1, p. 97-102, ago. 2013.

CORDEIRO, Mabel Mariela Rodriguez et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 8, p. 962-969, ago. 2008.

DEMARCO, Flávio F. et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v. 36, n. 11, p. 1805-1811, nov. 2010.

DUAILIBI, S. E. et al. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. **Journal of Dental Research**, Boston, v. 87, n. 8, p. 745-750, ago. 2008.

FORTIER, Lisa A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 415-423, abr. 2005.

HORST, Orapin V. et al. Stem cell and biomaterials research in dental tissue engineering and regeneration. **Dental Clinics North America**, v. 56, n. 3, p. 495-520, jul. 2012.

IOHARA, K. et al. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2408-2418, 2008.

LANGER, Robert; VACANTI, Joseph P. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, mai. 1993.

LI, Zhi-Yong; LIU, Lei; LI, Sheng-Wie. Odontogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.65, p. 494-500, 2007.

MIURA, M. et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **National academy of sciences**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, mai. 2003.

NA RYOUNG KIM; DONG HEE LEE; PILL-HOON CHUNG; HYEONG-CHEOL YANG. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology**, v.108, n. 5, p. 94-100, nov. 2009.

NÖR, Jacques Eduardo. Tooth regeneration in operative dentistry. **Operative Dentistry**, v. 31, n. 6, p. 633-642, 2006.

NOSRAT, Ali; KIM, Jong R.; VERMA, Prashant; CHAND, Priya S. Tissue engineering considerations in dental pulp regeneration. **Iranian Endodontic Journal**, v. 9, n. 1, p. 30-40, 2014.

PONNAYIAN, Deepa. Do dental stem cells depict distinct characteristics? Establishing their “phenotypic fingerprint”. **Dental Research Journal**, Tamil Nadu, v. 11, n. 2, p. 162-173, mar/abr. 2014.

PRESCOTT, Rebecca S. et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. **Basic research-biology**, v. 34, n. 4, p. 421-426, abr 2008.

RAVIDRAN, Sriram; HUANG, Chun-Chieh; GEORGE, Anne. Extracellular matrix of dental pulp stem cells: applications in pulp tissue engineering using somatic MSCc. **Frontiers in Physiology**, v. 4,n. 395, jan. 2014.

ROSA, Vinicius et al. Tissue engineering: From research to dental clinics. **Dental Materials**, v. 28, n. 4, p. 341-348, nov. 2012

ROSA, V. et al. Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 11, p. 970-975, ago. 2013.

SAKAI, V. et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 8, p. 791-796, fev. 2010.

SAKAI, V. et al. Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. **Advances in Dental Research**, v. 23, n. 3, p. 325-332, 2011.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **J Bras Neurocirurg**, v. 16, n. 1, p. 13-19, dec. 2005.

TABATABAEI, Fahimeh S.; TORSHABI, Maryam. Effects of non-collagenous proteins, TGF- β 1, and PDGF-BB on viability and proliferation of dental pulp stem cells, **Journal of oral and maxillofacial research**, v. 7, n. 1, 2016.

TASH, P. N. et al. BMP 2 and BMP 7 induce odonto- and osteogenesis of human tooth germ stem cells. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, p. 3016-3025, jan. 2014.

VATS, A. et al. Stem cells. **Lancet**, v. 366, n. 9485, p. 592-602, ago. 2005.

WAN, C. et al. The dentin sialoprotein (DSP) domain regulates dental mesenchymal cell differentiation through a novel surface receptor. **Scientific reports**, v. 6, jul. 2016.

YOUNG, C.S. et al. Tissue engineerin of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. **Journal of dental research**, v. 81, n. 10, p. 695-700, ago. 2002.

ZHANG, N. et al. Isolation, characterization and multi-lineage differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 1, p. 95-102, jul. 2016.

ZHANG, W. et al. The performance of human dental pulp stem cells on diferente three-dimensional scaffold materials. **Biomaterials**, v. 27, n. 33, p. 5658-5668, ago. 2006.

